ANTIKÖRPER GEGEN C-TYP RNS-VIREN WÄHREND DER ENTSTEHUNG VON STRAHLENINDUZIERTEN OSTEOSARKOMEN

Arwed Meier

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0022

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH
München
Institut für Biologie, Abteilung für Pathologie
Leiter: Prof. Dr. W. Gössner
vorgelegt über
das Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr

ANTIKÖRPER GEGEN C-TYP RNS-VIREN WÄHREND DER ENTSTEHUNG VON STRAHLENINDUZIERTEN OSTEOSARKOMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Arwed Meier
aus
Freiburg

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. J. Meyer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1	C-Typ Partikel, Begriffsbestimmung	2
2.2	Einteilung der endogenen murinen C-Typ Partikel	4
2.3	Immunreaktion gegen endogene murine Retroviren	5
2.3.1	Nachweis durch Immunpräzipitation	5
2.3.2	Virale Komponenten mit antigenen Eigenschaften	6
2.3.3	Abhängigkeit von Alter, Stamm und Tumorhäufigkeit	7
2.3.4	Bedeutung der Immunreaktion	8
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	10
3.1	Material und Methoden	10
3.1.1	Mäuseseren	10
3.1.2	Antiserum gegen Mäuse-IG-G	11
3.1.3	OS-2 Viren	12
3.1.3.1	Radioaktive Markierung von OS-2 Viren	12
3.1.3.2	Gewinnung radioaktiv markierter OS-2 Viren	13
3.1.3.3	Reinheit der Viruspräparation	15
3.1.4	Sonstige Viren	15
3.1.5	Der Radioimmunopräzipitationstest (RIP-Test)	16
3.1.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	16
3.2	Versuche und Ergebnisse	18
3.2.1	Optimierung der Versuchsbedingungen	18
3.2.2	Antikörper in Einzelseren	19
3.2.3	Verlauf des Antikörperspiegels bei Einzeltieren	25
3.2.4	Spezifität der Immunantwort	25
3.2.5	Bestimmung der gefällten Viruskomponenten	29
4.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	38
5.	ZUSAMMENFASSUNG	43
6.	LITERATURVERZEICHNIS	45

1. Einleitung

Bei zahlreichen Tieren und auch beim Menschen wurden in den letzten Jahren aus Tumoren verschiedenster Gewebe C-Typ Partikel isoliert. Ebenfalls gelang es, in den Seren mancher Spezies sowohl C-Typ Partikel oder zumindest Proteinbestandteile von ihnen als auch Antikörper, spezifisch für endogene Viren vom C-Typ, nachzuweisen. Es konnte jedoch nicht immer eindeutig geklärt werden, inwieweit die Viren am Tumorgeschehen beteiligt sind und wie sie durch die Immunreaktion des Körpers reguliert werden.

Im vorliegenden Fall wurden bei Mäusen Osteosarkome durch radioaktive Bestrahlung hervorgerufen. 50 % der behandelten Tiere wiesen im 12. Monat nach Beginn der Bestrahlung Tumore auf. Aus dem Skelett der Tumortiere und den Osteosarkomen selbst konnten Partikel mit einer 60 - 70 S RNS und einer reversen Transkriptase isoliert werden. Zudem wurden solche Partikel auch im Skelett von bestrahlten tumorfreien Tieren im 1. und im 11. Monat nach Bestrahlungsbeginn nachgewiesen (6, 7).

Aufgabe dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob im Verlauf der Bestrahlung während der Tumorlatenzzeit Antikörper gegen RNS-Viren vom C-Typ ausgebildet werden und wie sich ihr Titer verändert. Außerdem sollte im positiven Fall festgestellt werden, gegen welche viralen Proteinbestandteile die Immunreaktion gerichtet ist.

2. Schrifttum

2.1 C-Typ Partikel, Begriffsbestimmung

Die Retroviren oder RNS-Tumorviren der Mäuse bestehen morphologisch aus 2 Gruppen: den B-Partikeln, z.B. das Mammakarzinomvirus, und den C-Partikeln, z.B. die Leukämieviren.

Bei den Retroviren vom C-Typ handelt es sich um 1000 - 1200 Å große Partikel, die einen zentral gelegenen Innenkörper (core) aufweisen, der von einer lipidhaltigen Hülle umgeben ist. Ihr Genom besteht aus einer einsträngigen RNS, die einen Sedimentationskoeffizienten von 60 - 70 S im Sucrosegradienten hat. Sie enthalten eine RNS-abhängige DNS-Polymerase, die "reverse Transkriptase". Diese Viren können durch Infektion als exogene Viren erworben werden oder existieren als sogenannte endogene Viren.

AARONSON und STEPHENSON (1) definieren endogene C-Typ Viren als im Zellgenom einer Spezies existierend und die Information enthaltend, die für die Produktion virusspezifischer Genprodukte notwendig ist.

In Mäusen wurden C-Typ Partikel im Zusammenhang mit Lymphomen, Leukämien und Sarkomen nachgewiesen, an deren Entstehung sie möglicherweise direkt beteiligt sind (43). So können bei Mäusen vom AKR-Stamm mit häufigem natürlichem Leukämievorkommen in fast allen Tieren C-Typ Viren nachgewiesen werden. FINKEL et al. (10) fanden ebenfalls C-Typ Partikel in spontanen und strahleninduzierten Osteosarkomen von Mäusen und konnten mit ihnen wieder Osteosarkome durch Injektion in neugeborene Mäuse hervorrufen. Strukturkomponenten von

C-Typ Viren wurden auch in Zellinien von Mäusen gefunden, die keine offensichtliche Produktion der kompletten Viren aufwiesen und in tumorfreiem Mäusegewebe (41).

HUEBNER und TODARO (19) stellten die These auf, daß bei fast allen Lebewesen die genetische Information zur Produktion von C-Typ Viren ("das Virogen"), die die Information zur Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle ("das Onkogen") enthält, vertikal in einer verdeckten Form übertragen wird. Karzinogene wie Bestrahlung, Chemikalien usw. und der normale Alterungsprozeß bewirken eine Aktivierung dieser Gene. Dabei kann entweder nur das Onkogen oder das gesamte Virogen aktiviert werden. Struktur und Wirkungsmechanismus der vermuteten Genrepressoren sind jedoch unbekannt.

2.2 Einteilung der endogenen murinen C-Typ Partikel

Die Gruppe der endogenen murinen C-Typ Viren wird auf Grund ihres biologischen Verhaltens in 3 Gruppen eingeteilt (33):

a.) Die ecotropen Viren, die sich in Mäusezellen vermehren, wobei die "N-tropen" ecotropen Viren bevorzugt in Zellen von NIH-Swiss Mäusen, die "B-tropen" ecotropen Viren bevorzugt in Zellen von Balb/c Mäusen wachsen.

b.) Die xenotropen Viren, die in allen bisher untersuchten Mäusestämmen nachgewiesen wurden, sich jedoch nur in Zellen anderer Spezies als der Maus vermehren können. Diese Viren konnten bis jetzt noch nicht mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht werden.

c.) Die amphotropen Viren, die in Mäusen gefunden wurden, die wild in den Canyons bei Los Angeles gefangen worden waren. Sie vermehren sich sowohl in Mäusezellen als auch in den Zellen anderer Spezies. Ihre mögliche Beteiligung am Tumorgeschehen ist noch nicht erwiesen.

Die Mäuseviren der 3 Gruppen unterscheiden sich außerdem im serologischen Verhalten des hauptsächlichen Glykoproteins der Virushülle gp 71 (17).

2.3 Immunreaktion gegen endogene murine Retroviren

Früher nahm man an, daß es in den Mäusen eine Immuntoleranz gegenüber ihren endogenen Viren gibt, da im embryonalen Gewebe Antigenkomponenten dieser Viren nachgewiesen wurden (18). Der Nachweis von Antikörpern, die C-Typ Viren präzipitieren, im Serum verschiedener Mäusestämme (21, 37, 40) zeigte, daß von diesen endogenen Viren auch eine Antwort des Immunsystems hervorgerufen wird. Ebenso wurden präzipitierende Antikörper gegen das "Mouse Mammary Tumor Virus" (MMTV) in verschiedenen Mäusestämmen gefunden (2, 25, 36).

2.3.1 Nachweis durch Immunpräzipitation

Zum Nachweis dieser Immunantwort wird häufig der Radioimmunopräzipitationstest (RIP) verwendet. Er wurde 1962 erstmals von GERLOFF et al. (12) zum Nachweis von präzipitierenden Antikörpern gegen das Poliovirus benutzt. Das radioaktiv markierte Virus wird dabei mit Antiserum inkubiert; es schließt sich eine Inkubation mit Antiglobulinserum an. Dies führt zur Präzipitation des Globulinkomplexes zusammen mit dem Virus. Die Präzipitation der Radioaktivität wird als Maß der Antigen-Antikörperreaktion verwendet. Es wird beschrieben, daß dieser Test zum Virusnachweis 500fach sensitiver ist als der Virusneutralisationstest (21).

2.3.2 Virale Komponenten mit antigenen Eigenschaften

In verschiedenen Versuchen wurden die Antigenkomponenten der C-Typ Partikel bestimmt, die an der Immunreaktion beteiligt sind. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Immunkomplexe untersucht, die zwischen endogenen Viren und den Seren von verschiedenen Mäusestämmen entstanden sind. Dabei wurden Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 69000 bis 71000 (gp 69/71) bzw. 43000 (gp 43) und ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht 17000 (p 17) als wichtigste Antigenkomponenten festgestellt (16, 22). Die Bezeichnung p 17 wird später durch p 15(E) ersetzt, da dieses Protein im Unterschied zum eigentlichen p 15 auf der Virushülle (envelope) lokalisiert ist (24, 30). Das hauptsächliche interne Virusprotein hat ein Molekulargewicht von 30000 (p 30). Es wurde in den C-Typ Viren zahlreicher Spezies nachgewiesen (11), und es wurde gezeigt, daß die für eine gewisse Kreuzreaktivität mit Antikörpern verschiedener Säugerspezies verantwortlichen antigenen Komponenten vorwiegend hier zu finden sind (13, 14). Einige Untersucher stellten in Mäuseseren keine Immunreaktion gegen p 30 fest, was auf eine Immuntoleranz gegenüber diesem Protein hindeutet (16, 22). Von IHLE et al. (26) wird berichtet, daß die überwiegende Immunantwort gegen gp 71, das hauptsächliche Glykoprotein der Virushülle, gerichtet ist, was auch andere Untersucher bestätigen (22, 38, 45). Dieses Glykoprotein weist zwischen den ecotropen und xenotropen Viren deutliche serologische Unterschiede auf (33), wohingegen p 15(E) bei allen serologisch sehr ähnlich ist (27).

STEPHENSON et al. (45) berichten jedoch von einer Reaktion des murinen Immunsystems gegen p 30, stellen aber fest, daß die Reaktion gegen gp 71 weit stärker ist als die gegen p 30. Sie schließen daraus, daß die vermutete Immuntoleranz gegen p 30 durchbrochen werden kann. Zudem fanden sie die Anwesenheit der Viren immer mit dem Auftreten von Antikörpern verbunden. Obwohl das Gesamtvirus wesentlich mehr p 30 als gp 71 enthält, wird von HINO et al. (17) ein bedeutend höherer Anteil von gp 71 als von p 30 im Serum verschiedener Mäusestämme festgestellt. NOWINSKI et al. (39) konnten ebenfalls Serumantikörper finden, die das p 30 endogener Mäuseviren präzipitieren. BOIOCCHI et al. (3) wiesen sogar einen serologischen Polymorphismus für das virale p 30 verschiedener Mäusestämme nach.

Auch Katzen können präzipitierende Antikörper gegen das p 30 des Katzenleukämievirus (FeLV) ausbilden (4, 46). Diese wurden bei zahlreichen klinisch gesunden Tieren aus Populationen mit häufigem Vorkommen von FeLV und Tumoren gefunden.

2.3.3 Abhängigkeit von Alter, Stamm und Tumorhäufigkeit

In mehreren Untersuchungen wird von einem Anstieg das Antikörpertiters gegen endogene C-Typ Viren mit zunehmendem Alter der Mäuse berichtet (15, 21, 36, 37), der jedoch im Alter von 2 Jahren wieder abfällt. Der Titer erwies sich als altersbezogen aber nicht unbedingt altersabhängig, da auch bei unter 4 Wochen alten Tieren hohe Antikörpertiter nachgewiesen werden konnten. Ferner fanden IHLE et al. (23), daß die Ausbildung von präzipitierenden Antikörpern gegen C-Typ Viren bei einigen Mäusestämmen schon im Alter von 2 Monaten, bei

anderen erst mit 4 bis 5 Monaten beginnt. In Mäusestämmen mit häufigem natürlichem Vorkommen von Lymphomen wurden viel geringere Antikörpertiter nachgewiesen, als in Stämmen mit geringem natürlichem Lymphomvorkommen.

Ähnliche Ergebnisse resultieren aus den Versuchen von STEPHENSON et al. (46) an Katzen: Tiere, bei denen sich kein FeLV nachweisen ließ, hatten deutlich höhere Antikörpertiter als solche mit nachgewiesener Virusexpression. In tumortragenden Katzen fanden CHARMAN et al. (4) keine Antikörper gegen das p 30 des FeLV.

Im Gegensatz dazu berichten IHLE et al. (25) und ARTHUR et al. (2) von nachweisbaren Antikörpern gegen das MMTV nur in solchen Stämmen, bei denen häufig spontane Mammatumoren vorkommen. Die Antikörper erschienen vor dem Auftreten eines fühlbaren Tumors und ihr Titer war bei den Tieren am höchsten, die einen Tumor trugen. Durch künstliche MMTV-Infektion von Mäusestämmen, die eine geringe Inzidenz von Mammatumoren aufweisen, wurde gezeigt, daß der Antikörpertiter von der Virusdosis abhängig ist. Bei den Mäusen handelt es sich hierbei nur um quantitative Änderungen des Titers, da immer dieselben Antigenkomponenten an der Reaktion beteiligt sind (22).

2.3.4 Bedeutung der Immunreaktion

SCHWARTZ et al. (44) fanden in Versuchen mit C-Typ Viren in Mäusen, daß der Anstieg des Antikörpertiters mit einem Anstieg des Virustiters parallel ging. Sie zogen daraus den Schluß, daß den Antikörpern die Eliminierung der Viren aus dem Körper nicht gelingt. Außerdem wiesen sie nach, daß das Auftreten von Antikörpern gegen C-Typ Viren das Vorhandensein der Viren mit Sicherheit anzeigt,

ihr Fehlen jedoch nicht unbedingt das Fehlen der Viren bedeuten muß. KLEMENT et al. (31) konnten im Serum und in den Organen von Wild-Mäusen mit hoher Leukämierate infektiöse Viren ohne das Vorhandensein von Serumantikörpern finden.

NOWINSKI et al. (38) stellten dagegen fest, daß alle Mäuse, die nachweisbar Viren enthielten, auch Antikörper produzierten, und daß Tiere ohne nachweisbare Virusproduktion in Antikörperproduzenten und -nichtproduzenten unterteilt werden konnten. Das Fehlen von Antikörpern fanden sie untrennbar mit dem Fehlen von Viren verbunden, ohne jedoch die Bedeutung der Immunreaktion bei nicht nachweisbarem Virus erklären zu können. WEISLOW et al. (48), die die autogene Immunität von Affen gegen ihre endogenen C-Typ Viren untersuchten, bezweifeln, daß eine systemische humorale Immunität die Expression der xenotropen Viren in vivo reguliert.

IHLE et al. (29) untersuchten die Wirkung radioaktiver Bestrahlung von Mäusen auf die Ausbildung von Antikörpern gegen endogenes AKR-Virus und deren Bedeutung für die Leukämieentstehung. Sie stellten fest, daß die Ausbildung eines deutlichen Antikörpertiters stark beschleunigt wurde, dieser jedoch keinen Einfluß auf die Ausbildung des Tumors hatte, da bei 75 % der Tiere Antikörper nachweisbar waren, als sie an Leukämie verendeten. Daraus zogen sie den Schluß, daß nur eine sehr geringe oder gar keine Beziehung zwischen Ausbildung und Bestehenbleiben der Immunantwort gegen das Virus und dem Auftreten der Lymphome besteht. Sie konnten außerdem nur aus wenigen durch die Bestrahlung hervorgerufenen Tumoren Viren isolieren (28).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Mäuseseren

Die untersuchten Mäuseseren stammen von weiblichen $(C3Hx101)F_1$ Mäusen. Es handelt sich um SPF-Tiere, deren Stallungen nur nach Wechsel der Kittel über eine Desinfektionsmatte betreten werden dürfen. Die Tiere waren 2 x wöchentlich durch intraperitoneale Injektion mit einer Dosis von 0,5 µCi/kg Ra-224 in wässriger Lösung behandelt worden (34). Die natürliche Osteosarkominzidenz liegt bei diesem Mäusestamm unter 1 %, durch die Bestrahlung steigt sie auf fast 100 % (20, 34). Diese Behandlung war über 36 Wochen durchgeführt worden, beginnend im Alter von 4 Wochen, sodaß sich eine Gesamtdosis von 1050 rad ergibt. Jeweils im Abstand von 4 Wochen nach Versuchsbeginn waren 11 Monate lang 7 bestrahlte Mäuse sowie 7 Tiere aus der unbehandelten Kontrollgruppe aus der Vena jugularis entblutet worden. Das aus diesem Blut gewonnene Serum (ca. 0,5 ml/Tier) war mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 verdünnt und bei -70°C tiefgefroren worden. Außerdem wurden die Seren von 23 Mäusen untersucht, deren Blut nach dem sichtbaren Auftreten eines strahleninduzierten Osteosarkoms gewonnen worden war, sowie die Seren von je 7 unbehandelten Tieren im Alter von 4 Wochen und 24 Monaten.

Unmittelbar vor der Untersuchung wurden die Seren aufgetaut und eine Verdünnungsreihe von 1:25, 1:100, 1:400, 1:1600 und 1:6400 in TNE-Puffer (0,01 M Tris-Base, 0,15 M NaCl, 0,01 M EDTA, pH 7,9) hergestellt.

Zur Bestimmung des Antikörperspiegels von Einzeltieren über einen längeren Zeitraum wurde 5 weiblichen $(C3Hx101)F_1$ Mäusen im Abstand von 2 Wochen eine Dosis von je 0,28 µCi/kg Th-227 intraperitoneal injiziert. Am Tag vor Behandlungsbeginn wurde ihnen, sowie 4 Kontrolltieren, ca. 30 µl Blut durch Kupieren der Schwanzspitze genommen. Nach jeweils 4 Wochen erfolgten erneute Blutentnahmen am Schwanz. Die Blutproben wurden 1 Stunde bei Zimmertemperatur und über Nacht bei 4°C inkubiert, 15 Minuten bei 2300 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert und 10 µl Serum sofort untersucht. Es wurden Serumverdünnungen von 1:25, 1:400 und 1:3200 in TNE hergestellt.

3.1.2 Antiserum gegen Mäuse-IG-G

Einem weiblichen ca. 6 Monate alten Kaninchen wurde 1 mg Mäuse-IG-G (Firma Nordic Immunology) mit 1 ml Freud'schem Adjuvans komplett intramuskulär injiziert. Im Abstand von 6 Wochen erfolgten weitere Injektionen von 1 mg Mäuse-IG-G mit 1 ml Freud'schem Adjuvans inkomplett. Nach der 2. Injektion wurde aus der Ohrvene in wöchentlichem Abstand Blut entnommen. Das Blut wurde ebenfalls 1 Stunde bei Zimmertemperatur und über Nacht bei 4°C inkubiert und das Serum durch Zentrifugation (2300 UpM/15 Minuten) gewonnen. Jede Blutentnahme ergab etwa 5 - 10 ml Anti-Mäuse-IG-G-Serum, dessen Spezifität für Mäuse-IG-G durch seine Präzipitationsreaktion im Agargel getestet wurde. Gegen foetales Kälberserum, Ziegenserum und normales Kaninchenserum trat keine Präzipitation auf. Außerdem wurde die Reaktion mit käuflichem Kaninchen-Antiserum gegen Maus-γ-Globulin (Behringwerke) verglichen. Die Seren wurden bei -20°C gelagert und vor Verwendung 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

3.1.3 OS-2 Viren

Von einem strahleninduzierten Osteosarkom einer $(C3Hx101)F_1$ Maus war eine Fibroblastenzellinie in vitro kultiviert worden (9). Sie wird als Monolayer-Kultur in TCM 199-Medium (Firma Biocult) mit 10 % Kälberserum gehalten und 1 x wöchentlich passagiert. Aus dem Überstand dieser Zellkultur läßt sich ein Viruspartikel (OS-2) mit folgenden Charakteristika gewinnen, die typisch für RNS-Tumorviren sind (5, 8):

a.) Es weist C-Typ Morphologie auf
b.) Im Dichtegradienten bandet es bei 1,16-1,18 g/cm^3
c.) Es besitzt eine 60 - 70 S RNS
d.) Es läßt sich eine RNS-abhängige DNS-Polymerase nachweisen
e.) Es besitzt das gruppenspezifische Antigen der murinen C-Typ Viren

3.1.3.1 Radioaktive Markierung von OS-2 Viren

Die radioaktive Markierung der OS-2 Viren mit H-3-Leucin erfolgte in Anlehnung an IHLE et al. (21). 12 Stunden vor Beginn der Markierung wurde die Kultur mit TCM 199 ohne Leucin mit 2mM Glutamin und 1 % foetalem Kälberserum (FKS) versehen, um die Zellen an Leucin zu verarmen. Zur Markierung wurde das Medium entfernt und frisches Medium gleicher Zusammensetzung zugegeben, das 50 µCi/ml H-3-Leucin (spez. Aktivität 40 - 60 Ci/mol, Firma Schwarz/Mann) enthielt. Nach 24 Stunden wurde der Überstand gegen frisches Medium ohne Leucin mit 2mM Glutamin und 1 % FKS ausgewechselt (1. Virusernte). Die 2. Virusernte erfolgte 12 Stunden später.

3.1.3.2 Gewinnung radioaktiv markierter OS-2 Viren

Zur Gewinnung der Viren wurden die Kulturüberstände durch Zentrifugation bei 10 000 UpM für 10 Minuten in einer MSE-Zentrifuge gereinigt. Die Viren wurden durch 10 ml 20 % Sucrose in TNE-Puffer hindurch pelletiert, wobei sie 2 Stunden lang in einem Ausschwingrotor SW 27 bei 25 000 UpM zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 2 ml TNE gelöst, auf einen linearen Gradienten von 20 % - 50 % Sucrose in TNE gegeben und über Nacht bei 35 000 UpM in einem SW 41 Ausschwingrotor zentrifugiert. Beide Zentrifugationen erfolgten in einer Beckman L5·50 Ultrazentrifuge.

Der Gradient wurde in 22– 25 Fraktionen von 6 - 8 Tropfen unterteilt und jeweils 10 µl zur Bestimmung der Radioaktivität verwendet. Diese Menge wurde mit 10 ml "Biofluor"-Szintillationsflüssigkeit (New England Nuclear) vermischt und die Anzahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute, cpm) in einem Szintillationszähler der Nuclear Chicago Corp. für 10 Minuten je Probe gemessen. Das typische Ergebnis einer solchen Zählung ist in Abbildung 1 dargestellt. Das Virus bandet bei einer Sucrosekonzentration von ca. 36 %, entsprechend einer Dichte von 1,16 g/cm^3. Die Fraktionen, die die Viren enthielten, wurden vereinigt und über Nacht gegen TNE dialysiert, um sie von der Sucrose zu befreien. Zur weiteren Untersuchung wurde die Virussuspension durch Verdünnung mit TNE in der Regel auf 120 000 cpm/ml eingestellt.

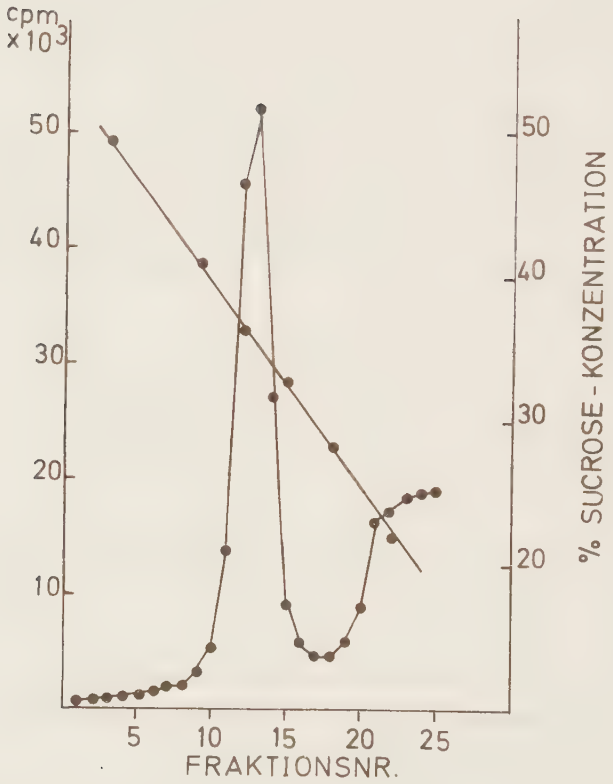

Abbildung 1: Isopyknischer Sucrosegradient von H-3-Leucin-markierten OS-2 Viren

3.1.3.3 Reinheit der Viruspräparation

Zur Testung der Reinheit der Viruspräparation stand ein Antiserum gegen OS-2 Viren vom Kaninchen zur Verfügung. Dieses Antiserum war, wie unter 3.1.2 für das Antiserum gegen Mäuse-IG-G beschrieben, hergestellt worden. Im Abstand von 6 Wochen wurde je 1 ml Virussuspension mit Freud'schem Adjuvans intramuskulär injiziert und jede Woche aus der Ohrvene Blut entnommen. Das Serum zeigte in der Agargelpräzipitation keine Reaktion mit Ziegenserum, foetalem Kälberserum, Kaninchenserum und dem "Aviären Myeloblastose Virus". Im RIP-Test (siehe 3.1.5) wurden 0,05 ml (= 6000 cpm) der Viruspräparation mit 0,05 ml dieses Antiserums 1 Stunde bei 37°C und eine weitere Stunde mit 0,1 ml Anti-Kaninchenserum von der Ziege nochmals bei 37°C inkubiert. Die weitere Untersuchung gestaltete sich wie unter 3.1.5 beschrieben.

3.1.4 Sonstige Viren

In die Untersuchungen wurden außerdem folgende C-Typ Viren mit einbezogen:

a.) "ML-X", xenotropes Mäusevirus der Balb/c Maus, gewachsen in einer Kultur von Nerz-Lungenzellen, die in Mc Coy's-Medium mit 10 % FKS gehalten wird.

b.) "SC-B", B-tropes Mäusevirus der Balb/c Maus, gewachsen in SC-Mäusefibroblasten und

c.) "SC-N", N-tropes Mäusevirus der C3H Maus, gewachsen in SC-Zellen, die in Dulbecco's Medium mit 10 % FKS gehalten werden.

Diese Kulturen waren von Herrn Dr. J.N.Ihle vom Frederick Cancer Research Center zur Verfügung gestellt worden. Sie wurden nach demselben Schema mit H-3-Leucin markiert und gewonnen, wie für das OS-2 Virus beschrieben.

3.1.5 Der Radioimmunopräzipitationstest (RIP-Test)

Der RIP-Test wurde ähnlich durchgeführt, wie von IHLE et al. (21) beschrieben. 0,05 ml der zu testenden Serumverdünnung und 0,05 ml markiertes Virus (= 6000 cpm) wurden in 0,4 ml TNE-Puffer miteinander vermischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde 0,1 ml Anti-Mäuse-IG-G-Serum vom Kaninchen, 1:10 in TNE verdünnt, zugegeben und erneut eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daran anschließend erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation bei 2300 UpM für 15 Minuten gewonnen. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Radioaktivität verwendet und das Pellet 3 x in 0,2 ml TNE gewaschen, um die noch vorhandene nicht gebundene Radioaktivität zu entfernen. Zur Radioaktivitätsmessung wurde das Pellet in 0,5 ml 0,1 N NaOH aufgelöst und das Reaktionsgefäß mit 0,5 ml destilliertem Wasser ausgespült. Die Zählung erfolgte ebenfalls in 10 ml "Biofluor" im Szintillationszähler. Die Präzipitation wurde definiert als Prozentsatz der radioaktiven Zerfälle im Pellet relativ zur Summe der Zerfälle in Präzipitat und Überstand.

3.1.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Darstellung der Virusproteine wurde die Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (47) angewendet. Der Dissoziationspuffer zur Proteinauftrennung und der Elektrophoresepuffer waren wie von LAEMMLI (32) beschrieben zusammengesetzt. Die Herstellung der Gele erfolgte nach LAEMMLI (32) und MAIZEL (35).

0,1 ml H-3-Leucin-markiertes Virus (= 150 000 cpm) wurde zusammen mit 0,1 ml Dissoziationspuffer 2 Minuten in kochendem Wasser erhitzt und auf das Gel gegeben. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele über Nacht bei -70°C eingefroren, um sie schneiden zu können. Mit Hilfe eines Elektrophorese-Gelschneiders (Firma Bio Rad Laboratories) wurden die Gele in 70 - 75 Scheiben von ca. 1 mm Größe fraktioniert. Diese wurden in Meßfläschchen für die Szintillation gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur in jeweils 0,5 ml 0,1 % SDS geschüttelt. 10 ml "Biofluor" wurden hinzugefügt und die Proben im Szintillationszähler gemessen. Das Gel mit den nicht radioaktiv markierten Standardproteinen wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit Coomassie-Blue angefärbt (42).

Folgende Proteine wurden als Standard benutzt:

Phosphorylase A	MG = 94 000
Serumalbumin vom Rind	MG = 68 000
Phosphatase	MG = 40 000
Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase	MG = 36 000
Kohlensäure-Anhydrase	MG = 29 500
β-Lactoglobulin	MG = 18 500
Lysozym	MG = 14 300

Sollten Immunpräzipitate mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht werden, so wurde 0,1 ml H-3-Leucin-markiertes Virus (= 150 000 cpm) mit 0,05 ml des zu testenden Serums in 0,35 ml TNE 1 Stunde bei 37°C unter Zusatz von 0,01 ml 10 % Triton-X-100 inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Anti-Mäuse-IG-G-Serum vom Kaninchen wurde erneut 1 Stunde bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 Minuten bei 2300 UpM) gewonnen, in 0,1 ml Dissoziationspuffer aufgenommen und weiterbehandelt, wie oben beschrieben.

3.2 Versuche und Ergebnisse

3.2.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

In Vorversuchen wurden die Bedingungen für den RIP-Test bestimmt, die zu den besten Ergebnissen führten. Die Präzipitationsrate der Viren stieg bis zu einer Verdünnung der Antiseren von 1:25 deutlich an und fiel danach allmählich wieder ab, sodaß die geringeren Serumverdünnungen nicht in die Untersuchungen einbezogen wurden. Eine höhere Verdünnung der Anti-Globulinseren als 1:10 bewirkte eine Verminderung der präzipitierten Antigen-Antikörperkomplexe. Geringere Verdünnungen ergaben jedoch keine nennenswerten Unterschiede, weshalb mit dieser Anti-Globulinserum-Konzentration weitergearbeitet wurde. Die Antigenkonzentration wurde anhand der Zerfälle pro Minute bestimmt, wobei sich 0,05 ml Virussuspension in TNE mit 6000 cpm als die beste Viruskonzentration erwies. Eine Erhöhung der Konzentration ergab keine Steigerung der prozentualen Präzipitation, dagegen führten höhere Verdünnungen des Antigens zu ihrer Verminderung.

Längere Inkubationszeiten als 1 Stunde bei 37°C ergaben höhere Hintergrundspräzipitationen. Dagegen führte die Inkubation bei 4°C für 2 Stunden oder 18 Stunden zu keinem wesentlichen Unterschied im Ergebnis, sodaß aus technischen Gründen immer über Nacht inkubiert wurde. Die Pellets waren am besten zu gewinnen, wenn 15 Minuten bei 2300 UpM zentrifugiert wurde.

3.2.2 Antikörper in Einzelseren

Von jedem zu testenden Serum wurde eine Verdünnungsreihe (1:25, 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 in TNE) angelegt und eine Doppelbestimmung der Präzipitation in jeder Verdünnungsstufe durchgeführt. Der Mittelwert der Doppelbestimmung wurde als die Präzipitation des betreffenden Serums in der jeweiligen Verdünnungsstufe angesehen. Dabei differierten die Doppelbestimmungen um maximal 8 % voneinander.

Außerdem wurde für jede Versuchsreihe die Hintergrundspräzipitation bestimmt, indem statt Testserum 0,05 ml TNE mit dem H-3-Leucin-markierten Virus zusammengebracht und dann wie üblich weiterbehandelt wurde. Dadurch sollten eventuelle unspezifische Reaktionen des Virus mit dem Anti-Globulinserum oder spontane Präzipitationen der Virussuspension während der Lagerung bestimmt werden. Die Präzipitationsrate lag hierbei zwischen 7 % und 12 % und wurde von den Ergebnissen der jeweiligen Versuchsreihe abgezogen. Alle angeführten Ergebnisse sind bereits um die Hintergrundspräzipitation korrigiert.

Zum Nachweis der Spezifität der Serumantikörper für C-Typ Viren wurde 0,1 ml FKS mit 0,05 ml Testserum (1:25 in TNE) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 0,05 ml H-3-markiertes OS-2 Virus wurde zugegeben und der RIP-Test durchgeführt. Die Präzipitationen lagen nur geringfügig unter den Werten, die erreicht wurden, wenn dem RIP-Test keine Inkubation mit FKS vorausging. Dies zeigt die Spezifität der Antigen-Antikörperreaktion, da die Antikörper nur in geringem Umfang durch das in erheblichem Überschuß vorhandene FKS gebunden wurden.

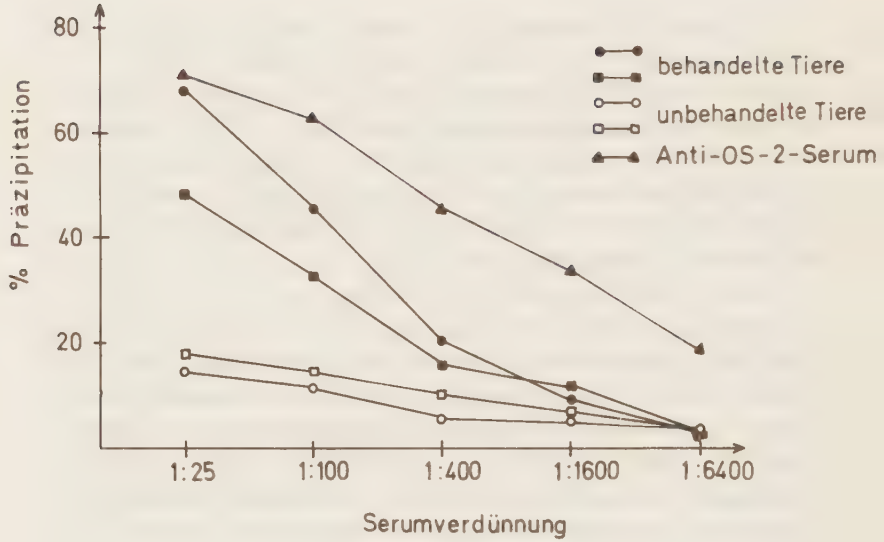

Abbildung 2: Titrationskurven von H-3-Leucin-markierten OS-2 Viren mit Seren behandelter und unbehandelter Mäuse und dem Anti-OS-2-Serum vom Kaninchen.

Abbildung 2 zeigt als Beispiel die Titrationskurven von 2 Seren bestrahlter Tiere sowie die von 2 Seren unbehandelter Kontrolltiere aus dem 3. Monat nach Bestrahlungsbeginn. Ferner ist eine Titrationskurve mit Anti-OS-2-Serum vom Kaninchen dargestellt. Dieses Antiserum diente als positives Kontrollserum und erreichte 71 % - 76 % Präzipitation bei einer Verdünnung von 1:25. Solch hohe Werte wurden mit keinem der getesteten Mäuseseren

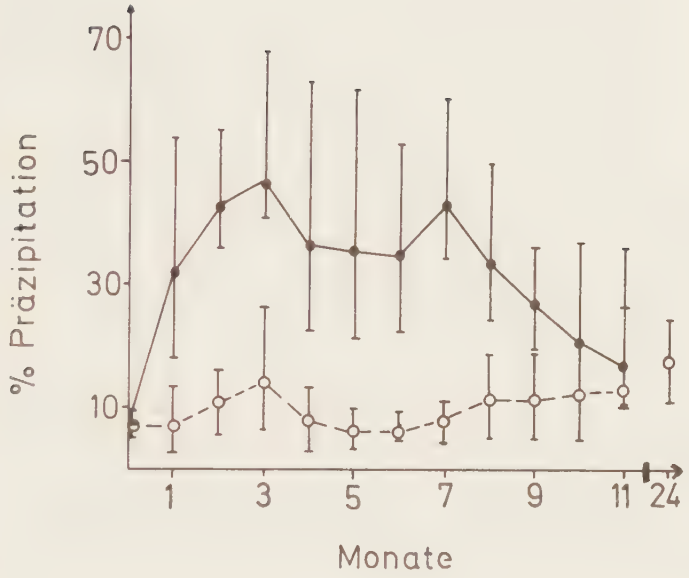

Abbildung 3: Durchschnittliche Präzipitationen der Seren behandelter und unbehandelter Tiere bei Verdünnung von 1:25 im jeweiligen Behandlungsmonat. Geschlossene Kreise: behandelte Tiere, offene Kreise: unbehandelte Tiere

erreicht, sodaß man 76 % als die höchstmögliche Präzipitationsrate für das OS-2 Virus unter diesen Bedingungen ansehen kann.

Die Seren der mit Ra-224 behandelten Tiere und die der Kontrollmäuse wurden bei einer Verdünnung von 1:25 untersucht. Höhere Verdünnungen eigneten sich schlechter,

da sie bei den Kontrolltieren zum Teil Präzipitationen von weniger als 5 % aufwiesen. Der Mittelwert der Präzipitationen der 7 Seren aus jedem Monat wurde als Maß für den durchschnittlichen Antikörperspiegel der Tiere gegen das OS-2 Virus zum betreffenden Zeitpunkt angesehen. Diese Werte sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Striche zeigen den höchsten und den niedrigsten Einzelwert der 7 Präzipitationen an. Außerdem ist der Mittelwert der 7 Seren abgebildet, die am Tage des Bestrahlungsbeginns gewonnen worden waren. Ferner sind die Werte der Kontrolltiere dargestellt, die 24 Monate nach Versuchsbeginn getötet worden waren.

Bei den Kontrolltieren zeigt sich ein Anstieg des Mittelwertes der Präzipitationen bis zum 3. Monat nach Untersuchungsbeginn, der bis zum 6. Monat sogar unter den Ausgangswert absinkt. Danach steigt er kontinuierlich an. Die höchste ermittelte Präzipitationsrate der unbehandelten Tiere liegt im 11. Monat bei 27 %.

Bereits 4 Wochen nach Beginn der Bestrahlung übertrifft der Mittelwert der Präzipitationen der behandelten Tiere denjenigen der Kontrolltiere durchschnittlich um das 4,5fache. Er steigt noch weiter an mit dem Höchstwert von durchschnittlich 48,8 % im 3. Monat. Danach sinkt der Mittelwert wieder ab, bleibt jedoch deutlich über dem der Kontrolltiere. Im 7. Monat nach Bestrahlungsbeginn zeigt sich ein neuer Gipfel des Antikörperspiegels, der aber die Höhe des 3. Monats nicht mehr ganz erreicht. In den folgenden Monaten sinkt er kontinuierlich ab, und im 11. Monat liegt der Mittelwert der Seren behandelter Tiere nur noch um 1,4 % über dem der Kontrollmäuse. Der niedrigste bei den bestrahlten Tieren ermittelte Wert liegt im 11. Monat bei 10,8 %.

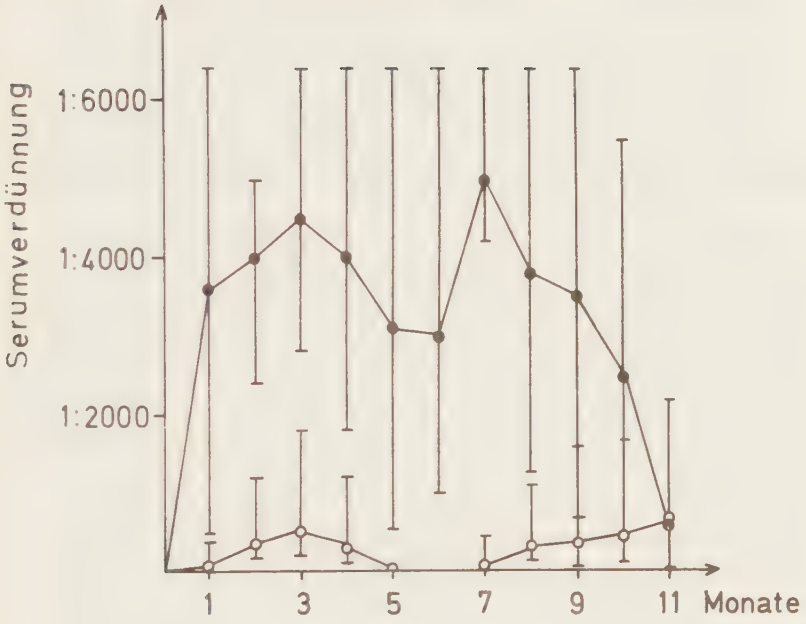

Abbildung 4: Durchschnittliche Serumverdünnung, bei der die Seren im jeweiligen Behandlungsmonat 10 % Präzipitation aufwiesen. Geschlossene Kreise: behandelte Tiere, offene Kreise: unbehandelte Tiere

Einen ähnlichen Verlauf wie die Kurve der durchschnittlichen Präzipitationen zeigt die Titerkurve (Abbildung 4). Als positiver Titer wurden 10 % Präzipitation im RIP-Test angesehen. Es wurde untersucht, bei welcher Serumverdünnung die 7 Seren des jeweiligen Monats durchschnittlich 10 % Präzipitation aufwiesen. Die Striche zeigen die höchsten und niedrigsten Werte an. Bei den

behandelten Tieren sind wieder die beiden Gipfel im 3. und 7. Monat nach Bestrahlungsbeginn und der Abfall der Kurve nach dem 7. Monat vorhanden. Bei den Kontrolltieren weist im 5. Monat nur 1 Tier und im 6. Monat kein Tier einen positiven Titer auf. Ab dem 7. Monat steigt ihr durchschnittlicher Titer kontinuierlich an.

23 Seren von Tieren, die nach dem klinischen Auftreten eines Osteosarkoms getötet worden waren, wurden ebenfalls untersucht. Es stand 1 Serum eines Tieres zur Verfügung, das im 9. Monat nach Bestrahlungsbeginn ein Sarkom aufwies, 3 aus dem 10., 2 aus dem 11., 13 aus dem 12., 3 aus dem 13. und 1 Serum aus dem 14. Monat. Die durchschnittlichen Präzipitationen bei einer Serumverdünnung von 1:25 sowie die jeweils höchsten und niedrigsten Werte sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Durchschnittswerte steigen kontinuierlich an, je später die Tiere Osteosarkome aufwiesen.

	durchschn.	höchste	niedrigste
	Präzipitation in %		
9. Monat (1)	13,0	-	-
10. Monat (3)	15,7	19,2	11,7
11. Monat (2)	16,3	19,9	12,8
12. Monat (13)	21,1	32,7	12,6
13. Monat (3)	23,5	24,6	21,7
14. Monat (1)	25,1	-	-

Tabelle 1: Präzipitationsraten der Seren von Mäusen mit sichtbaren Sarkomen bei Verdünnung 1:25 in TNE

3.2.3 Verlauf des Antikörperspiegels bei Einzeltieren

Zur Untersuchung des Verlaufs des Antikörperspiegels bei Einzeltieren wurde das Blut von 5 Mäusen, denen im Abstand von 2 Wochen je 0,28 µCi/kg Th-227 intraperitoneal injiziert wurde, und von 4 Kontrolltieren durch Kupieren der Schwanzspitze gewonnen. Die Blutentnahmen erfolgten im Abstand von 4 Wochen. Das Serum wurde sofort im RIP-Test untersucht, ohne zwischenzeitliche Lagerung bei -70°C. Die Präzipitation der OS-2 Viren durch Seren behandelter und unbehandelter Tiere (1:25 in TNE) zeigt Abbildung 5. Zudem sind die Mittelwerte der Präzipitationen aller Seren dargestellt.

Es zeigt sich, daß der Durchschnittswert des Antikörperspiegels ebenfalls bis zum 3. Monat ansteigt und danach wieder abfällt. Bei je einem behandelten und unbehandelten Tier erreicht er sein Maximum erst im 4. Monat nach Bestrahlungsbeginn. Die Stimulation der Immunreaktion durch die Bestrahlung ist nur im 3. und 4. Behandlungsmonat feststellbar. Ab dem 5. Monat steigen die Präzipitationen wieder kontinuierlich an ohne wesentliche Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Bei keinem der Tiere konnte bis zum 7. Behandlungsmonat ein Tumor gefunden werden.

3.2.4 Spezifität der Immunantwort

Durch vergleichende RIP-Tests sollte ermittelt werden, gegen welche Art von C-Typ Mäuseviren die Immunantwort gerichtet ist. Dazu wurden die B-tropen und N-tropen ecotropen Viren (SC-B und SC-N) sowie die xenotropen

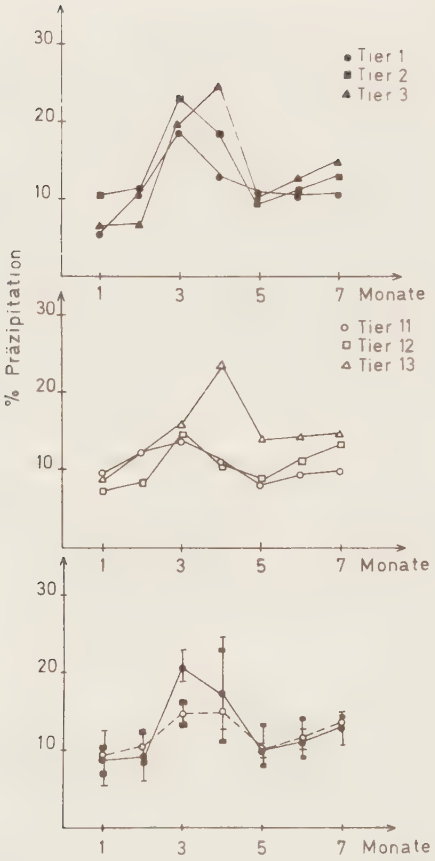

Abbildung 5: Präzipitationen der Seren behandelter und unbehandelter Einzeltiere sowie deren Durchschnittswerte im jeweiligen Behandlungsmonat. Geschlossene Symbole: behandelte Tiere, offene Symbole: unbehandelte Tiere

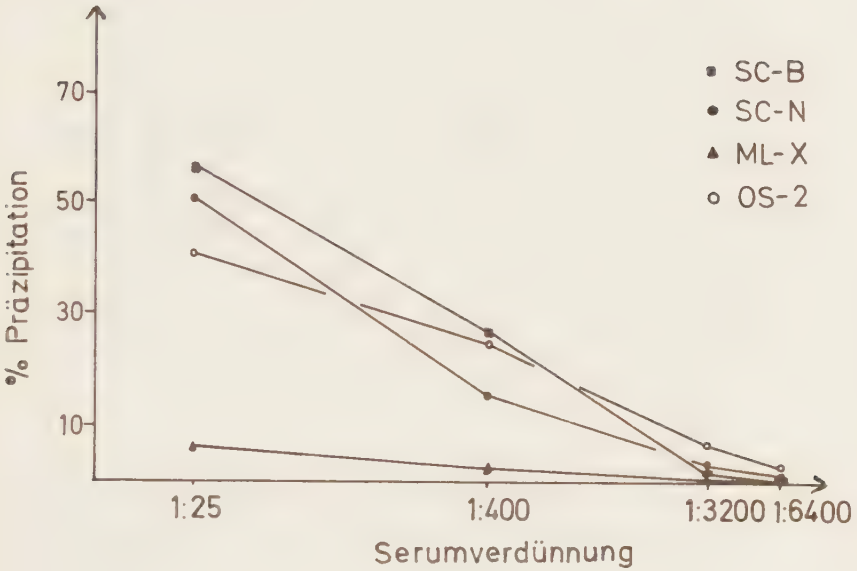

Abbildung 6: Titrationskurven von H-3-Leucinmarkierten Viren mit Mäuseserum aus dem 3. Monat

Viren (ML-X) mit H-3-Leucin markiert. Abbildung 6 zeigt die Titrationskurven der 3 Virustypen gegen die Serumverdünnungen einer Maus aus dem 3. Behandlungsmonat. Außerdem ist die Titrationskurve dieses Serums gegen das OS-2 Virus dargestellt. Die Präzipitation mit SC-N und SC-B ist bei der Verdünnungsstufe 1:25 höher als mit OS-2. Das xenotrope Virus (6,1 % Präzipitation) wird praktisch nicht präzipitiert.

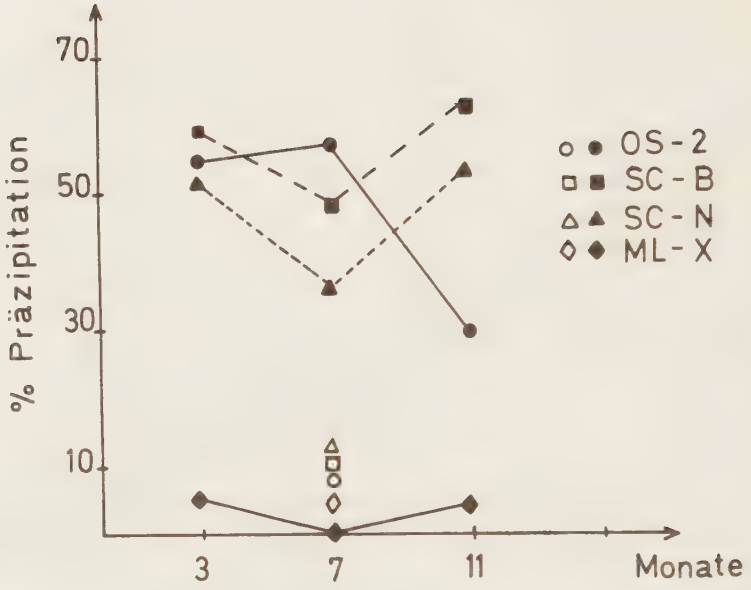

Abbildung 7: Durchschnittliche Präzipitationen von je 2 Seren behandelter Tiere aus dem 3., 7. und 11. Monat und 2 Seren unbehandelter Tiere aus dem 7. Monat. Geschlossene Symbole: behandelte Tiere, offene Symbole: unbehandelte Tiere

Zum Vergleichstest wurden je 2 Seren behandelter Tiere aus dem 3., 7. und 11. Monat und 2 Seren von Kontrolltieren aus dem 7. Monat nach Behandlungsbeginn verwendet. In Abbildung 7 sind die durchschnittlichen Präzipitationen dieser Seren mit den Viren bei einer Serumverdünnung von 1:25 dargestellt.

Es zeigt sich, daß keines der 8 Seren eine echte Präzipitationsreaktion mit dem xenotropen ML-X Virus aufweist. Auch in der Literatur liegen keine Angaben über die Bildung von präzipitierenden Antikörpern gegen xenotrope Mäuseviren vor. Im 7. Monat haben die Seren behandelter Tiere eine höhere Präzipitationsrate mit dem OS-2 Virus als mit den beiden ecotropen Viren. Im 11. Monat liegt der Wert für OS-2 jedoch deutlich unter denen von SC-B und SC-N. Die Präzipitationsraten der Viren durch die Seren aus dem 3. Behandlungsmonat unterscheiden sich nur geringfügig. Ebenso weichen die durchschnittlichen Präzipitationen für SC-N, SC-B und OS-2 mit den Kontrollseren nur wenig voneinander ab.

3.2.5 Bestimmung der gefällten Viruskomponenten

Zur Bestimmung der viralen Proteinbestandteile, gegen die die Antikörperbildung gerichtet ist, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet. Zunächst wurden die Gesamtproteine des intakten mit H-3-Leucin markierten OS-2 Virus untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Es sind 7 Gipfel der radioaktiven Zerfälle erkennbar und entsprechend numeriert. Nr. 1 und Nr. 2 sind nur schwach ausgeprägt. Sie repräsentieren wahrscheinlich die hochmolekularen Glykoproteine gp 71 und gp 43. Dies kann jedoch mit der H-3-Leucinmarkierung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der 3. Gipfel kann dem hauptsächlichen internen Virusprotein p 30 zugeordnet werden. Im niedemolekularen Bereich sind 4 Gipfel vorhanden, von denen Nr. 4 mit p 15(E) und Nr. 5 mit p 15 gleichzusetzen ist. In Nr. 6 wird p 12 und in Nr. 7 p 10 sichtbar. Die höchste Spitze zeigt p 30, gefolgt von p 12, p 15, p 10 und den schwachen Spitzen der Glykoproteine.

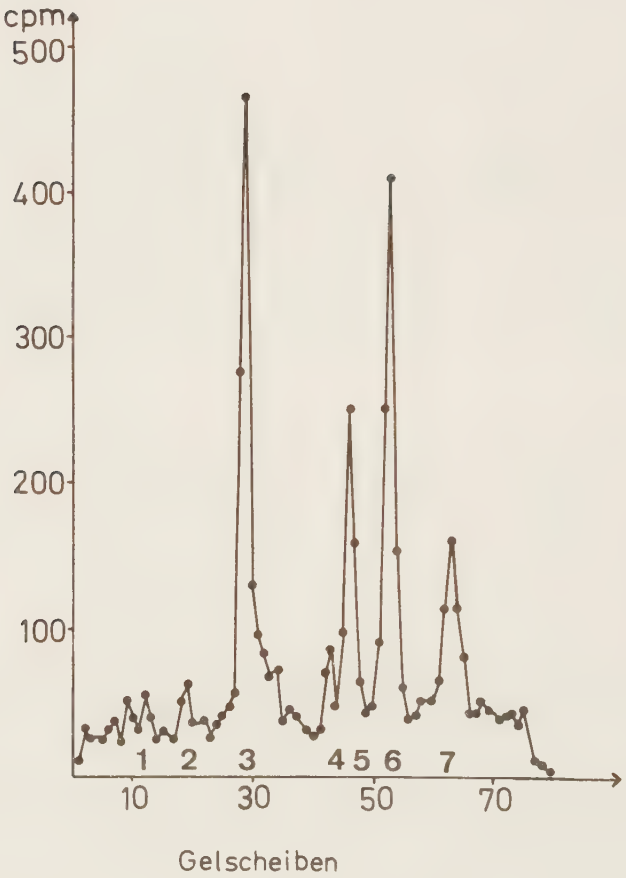

Abbildung 8: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des gesamten mit H-3-Leucin markierten OS-2 Virus

7 Gipfel weist auch das Gelprofil der Präzipitation der Viren mit Anti-OS-2-Serum vom Kaninchen auf (Abbildung 9). Sie treten in denselben Gelfraktionen wie beim intakten Virus auf, sodaß sie den entsprechenden Proteinen zugeordnet wurden. Es fällt auf, daß die Spitzen für p 30 und p 12 etwas tiefer liegen als beim Gesamtvirus, diejenigen für p 15 und p 10 jedoch bedeutend geringer ausgeprägt sind. Für p 15(E) zeigt sich kein Unterschied. Nr. 1 und Nr. 2 treten deutlich in Erscheinung.

Das Ergebnis der Präzipitationen mit einzelnen Mäuseseren ist in Abbildung 10 dargestellt. Hier wurde als Beispiel Serum einer bestrahlten Maus aus dem 11. Monat nach Beginn der Behandlung verwendet. Alle 7 Spitzen sind wieder erkennbar und entsprechend ihrer Mobilität im Gel den einzelnen Proteinen zugeordnet worden. Nr. 1 und Nr. 2 sind deutlich ausgeprägt. Ihre Spitzen überragen sogar etwas diejenigen der niedermolekularen Proteine außer p 12. Auffallend ist, daß p 12 einen wesentlich höheren Gipfel als p 30 erreicht. Außerdem liegt der Wert für p 15(E) höher als der für p 10, und p 15 zeigt nur eine sehr schwache Spitze. Diese Werte stimmen mit denen von anderen behandelten Tieren überein, außer daß p 15 meist p 10 überragt.

Abbildung 11 zeigt die Präzipitation der Viren mit dem Serum eines Kontrolltieres aus dem 3. Monat. Die Gipfel Nr. 1 und Nr. 2 sind auch hier erkennbar, ihre Spitzen jedoch geringer ausgeprägt als die von Nr. 3 bis Nr. 7. Es fällt wieder der hohe Gipfel bei p 12 auf, gefolgt von einem deutlich schwächeren bei p 30. P 15(E) übertrifft p 15, das seinerseits p 10 überragt. Diese Unterschiede zwischen p 15(E), p 15 und p 10 differieren bei verschiedenen Seren. Jedoch sind deren Spitzen immer geringer als die von p 12 und p 30.

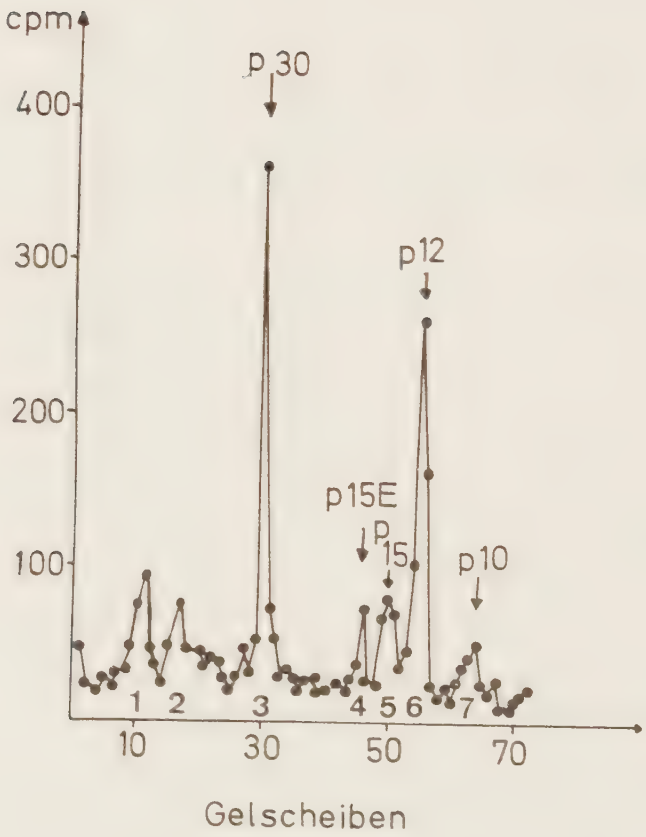

Abbildung 9: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des mit H-3-Leucin markierten OS-2 Virus nach Präzipitation mit Anti-OS-2-Serum vom Kaninchen. Präzipitation im RIP-Test: 72,3 %

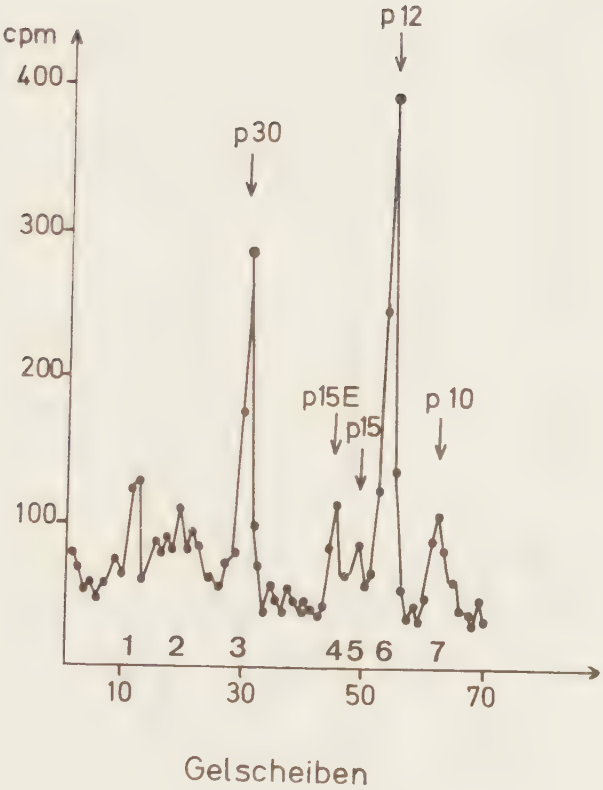

Abbildung 10: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des mit H-3-Leucin markierten OS-2 Virus nach Präzipitation mit dem Serum einer behandelten Maus. Präzipitation im RIP-Test: 21,5 %

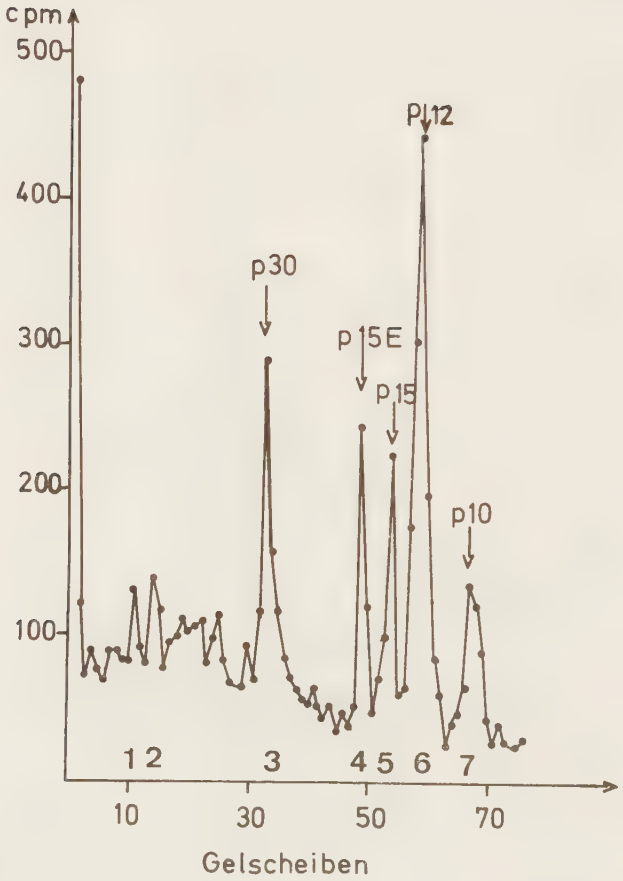

Abbildung 11: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des mit H-3-Leucin markierten OS-2 Virus nach Präzipitation mit dem Serum einer unbehandelten Maus. Präzipitation im RIP-Test: 17,6 %

Das Gelprofil der Reaktion von Anti-Mäuse-IG-G-Serum vom Kaninchen mit dem OS-2 Virus ist in Abbildung 12 dargestellt. Hier treten nur die Proteine Nr. 3 und Nr. 6 deutlich in Erscheinung. Die Präzipitation des Virus mit TNE-Puffer ergibt ein beinahe gleiches Bild (Abbildung 13). Auch hier sind nur die Gipfel von p 30 und p 12 besonders ausgeprägt. Somit handelt es sich bei der Fällung dieser Proteine nicht um eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion gegen die OS-2 Viren.

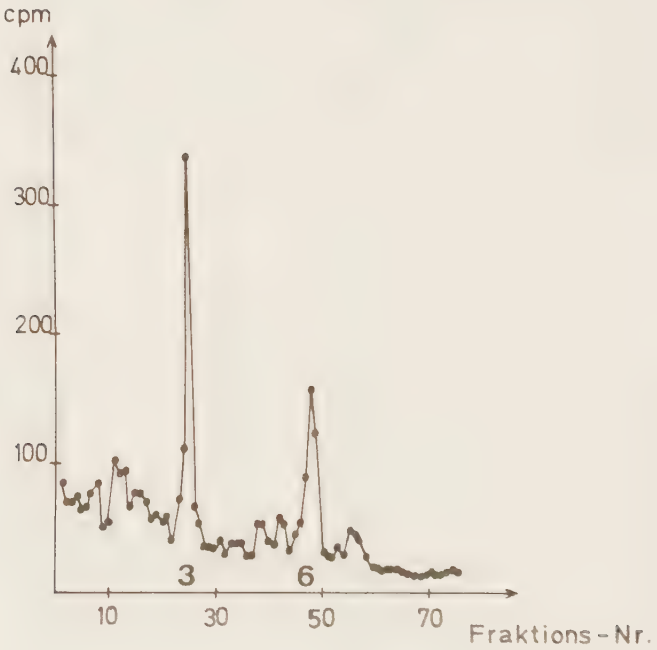

Abbildung 12: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des mit H-3-Leucin markierten OS-2 Virus nach Präzipitation mit Anti-Mäuse-IG-G-Serum vom Kaninchen

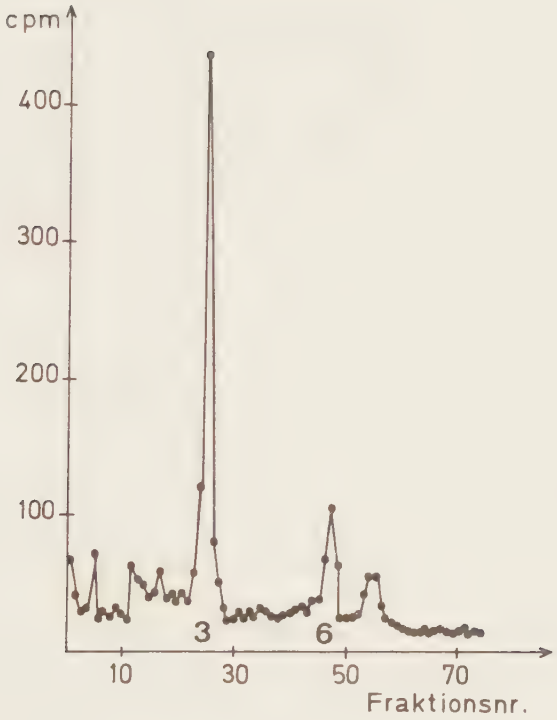

Abbildung 13: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des mit H-3-Leucin markierten OS-2 Virus nach Präzipitation mit TNE-Puffer

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigen, daß (C3Hx101)F_1 Mäuse Antikörper gegen C-Typ Viren (OS-2 Viren) bilden. Diese Immunreaktion ist bei unbehandelten Tieren ab dem 2. Lebensmonat (d.h. 1. Monat nach Versuchsbeginn) im RIP-Test nachweisbar. Die Präzipitationsraten betragen um 10 %. Der Antikörperspiegel steigt bis zum 4. Lebensmonat an, fällt danach wieder ab, und im 7. Monat weisen alle Seren Präzipitationsraten unter 10 % auf. Vom 8. Lebensmonat steigt er erneut kontinuierlich an. Diese Daten stimmen mit früheren Ergebnissen überein, in denen von einem höheren Antikörpertiter bei älteren Mäusen im Vergleich zu jungen Tieren berichtet wird (15, 21, 36, 37). Es liegen jedoch keine vergleichbaren Angaben über Tiere vor, die über etliche aufeinanderfolgende Monate untersucht worden sind.

Die Bestrahlung mit Ra-224 über 36 Wochen führt bereits 4 Wochen nach Beginn zu einem Anstieg des Antikörperspiegels um das 4,5fache gegenüber dem der unbehandelten Kontrolltiere. ERFLE et al. (6) fanden bei bestrahlten Mäusen im 1. Monat nach Behandlungsbeginn virale 60 - 70 S RNS sowie reverse Transkriptase im Knochengewebe. Bei den behandelten Tieren steigt der Antikörpertiter ebenfalls bis zum 3. Monat nach Bestrahlungsbeginn (d.h. 4. Lebensmonat) an und fällt danach bis zum 6. Bestrahlungsmonat ab. Ein Anstieg des Titers ist nochmals im 7. Monat nach Beginn der Behandlung festzustellen. In dieser Zeit ist in den Knochen weder virale RNS noch reverse Transkriptase nachweisbar. Erst im 11. und 12. Behandlungsmonat treten diese Virusbestandteile wieder auf, wohingegen der Antikörperspiegel nach dem 7. Bestrahlungsmonat kontinuierlich absinkt und im 11. Monat denjenigen

unbehandelter Mäuse fast erreicht. Die ersten stranlen-induzierten Osteosarkome treten ab dem 9. Monat auf (6).

Es wurde nachgewiesen, daß bei den bestrahlten Tieren gleichzeitig mit der Virusexpression im 1. Behandlungsmonat eine deutliche Immunantwort ausgebildet wird. Die aktivierten Viruspartikel verschwinden daraufhin und können erst nach dem Absinken des Antikörperspiegels ab dem 11. Monat wieder gefunden werden. Auch bei tumortragenden Tieren konnten Serumantikörper nachgewiesen werden, deren durchschnittlicher Spiegel umso höher lag, je älter die Tiere bis zum Auftreten des Tumors geworden waren.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine Rückschlüsse auf die möglichen Ursachen für das Absinken des Antikörperspiegels zu. Es wäre möglich, daß die Antikörper von einer zunehmenden Antigenmenge verbraucht werden. Ein weiterer möglicher Grund für das Sinken des Antikörperspiegels wäre eine allgemeine Immunsuppression durch die Bestrahlung.

Die Stimulierung der Immunreaktion durch radioaktive Bestrahlung wird zudem aus der Verlaufskurve des Antikörperspiegels bei Einzeltieren, die über mehrere aufeinanderfolgende Monate untersucht worden waren, sichtbar (Abbildung 5). Hier treten jedoch nur im 3. und 4. Behandlungsmonat Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren auf. Zudem zeigt sich ein erneuter kontinuierlicher Anstieg der Titerkurve ab dem 5. Monat nach Behandlungsbeginn. IHLE et al. (29) konnten lediglich eine Beschleunigung der Antikörperbildung, nicht aber eine Stimulierung durch die Bestrahlung feststellen.

Es bleibt die Frage offen, ob die Antikörper immer gegen dasselbe oder gegen verschiedene endogene C-Typ Viren gerichtet sind. Im Vergleich mit ecotropen endogenen Viren übertrifft der Antikörperspiegel gegen OS-2 denjenigen gegen SC-B und SC-N im 7. Behandlungsmonat. Im 11. Monat liegt der Spiegel gegen die ecotropen Viren jedoch höher als gegen OS-2. Daraus könnte geschlossen werden, daß es sich um etwas verschiedene Viren handelt. Dieses Phänomen bedarf jedoch noch einer weiteren Klärung.

Bei den (C3Hx101)F, Mäusen war die Expression virusspezifischer Bestandteile immer mit dem Auftreten von Antikörpern verbunden, was auch von anderen Mäusestämmen berichtet wird (38, 45), nicht jedoch von Katzen (46). Dies deutet auf eine unterschiedliche Immunreaktion gegen C-Typ Viren bei verschiedenen Spezies hin.

Nur bei einem Teil der Tiere mit positivem Antikörpertiter (Präzipitationsraten über 10 %) ließ sich virale RNS und reverse Transkriptase nachweisen. Dagegen waren sämtliche Tiere mit negativem Titer auch frei von Viren oder deren Bestandteilen. NOWINSKI et al. (38) und STEPHENSON et al. (45) teilen virusfreie Mäuse und Katzen ebenfalls in Antikörperproduzenten und -nichtproduzenten ein.

Die untersuchten OS-2 Viren wurden zwar aus den Osteosarkomen isoliert (5), ihre Beteiligung am Tumorgeschehen ist jedoch nicht klar. Den Antikörpern gelingt es nicht, eine erneute Virusexpression im 11. Monat zu verhindern oder die freigesetzten Viren aus dem Körper zu eliminieren, was auch die Versuche von SCHWARTZ et al. (44) ergaben. Außerdem kann die Immun-

reaktion die Entstehung der strahleninduzierten Osteosarkome nicht verhindern.

Dem Auftreten der Tumore geht ein deutlicher Abfall des Antikörperspiegels voraus, und insofern besteht eine Korrelation zwischen der Entstehung der Tumore und den Antikörpern gegen die OS-2 Viren. Bei Mäusen mit strahleninduzierter Leukämie konnte keine Beziehung zwischen Antikörpern und Tumoren nachgewiesen werden (29). Dagegen haben Mäuse mit sichtbaren Mammatumoren die höchsten Antikörpertiter gegen das MMTV (25).

Die Präzipitation von lysiertem Virus ergibt die Fällung aller viralen Strukturproteine (Abbildung 8). Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, daß p 30 und p 12 auch ohne Zugabe von Antikörpern präzipitiert werden können. Ihre Fällung stellt somit keine Antigen-Antikörperreaktion dar, sondern eine unspezifische Präzipitation, die auf eine mangelhafte Lyse der viralen Innenkörper hindeutet. Berücksichtigt man dies, so bestätigt die Analyse der Immunpräzipitate in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, daß die OS-2 Viren nicht mit heterologen Seren gefällt werden können (Abbildung 12).

An der Reaktion mit den präzipitierenden Antikörpern in den Seren bestrahlter Mäuse ist demnach hauptsächlich gp 71 beteiligt (Abbildung 10). In mehreren Untersuchungen an verschiedenen Mäusestämmen (22, 26, 38, 45) wird ebenfalls berichtet, daß die wesentliche humorale Immunreaktion gegen gp 71 gerichtet ist. Daneben werden p 15(E) und p 15 noch in erheblichem Umfang präzipitiert, was auch IHLE et al. (22) und NOWINSKI et al. (38) nachwiesen. Dieselben Strukturproteine, jedoch in anderem Verhältnis, werden von den Seren unbehandelter Mäuse präzipitiert (Abbildung 11).

An den unterschiedlich hohen Präzipitationen verschiedener Seren mit H-3-Leucin-markierten OS-2 Viren sind somit immer Antikörper gegen die gleichen Antigenkomponenten beteiligt. Lediglich der Antikörperspiegel variiert zwischen den einzelnen Tieren, was auch IHLE et al. (22) aus ihren Versuchen schlossen.

Antikörper gegen das hauptsächliche interne Virusprotein (p 30) konnten in den Mäuseseren nicht nachgewiesen werden. Sie wurden bei Mäusen jedoch von STEPHENSON et al. (45) und NOWINSKI et al. (39), wenn auch in wesentlich geringerem Umfang als gegen gp 71, gefunden. Bei Katzen hatten sie sogar einen höheren Titer als die Antikörper gegen gp 71 (46).

5. Zusammenfassung

Im Serum weiblicher (C3Hx101)F_1 Mäuse ließen sich mit Hilfe des Radioimmunopräzipitationstestes präzipitierende Antikörper gegen ein C-Typ Virus (OS-2 Virus) nachweisen. Deren Spiegel zeigt im 4. Lebensmonat ein vorübergehendes Maximum und steigt ab dem 7. Lebensmonat kontinuierlich an.

Die Bestrahlung der Tiere mit Ra-224 erhöht den Antikörperspiegel gegenüber dem der Kontrolltiere mit Gipfeln im 3. und 7. Monat nach Beginn der Behandlung. Er liegt bis zum 7. Behandlungsmonat durchschnittlich um das 4,5fache über dem Spiegel unbehandelter Tiere. Ab dem 8. bis zum 11. Monat nach Bestrahlungsbeginn fällt er ungefähr bis zu den Werten der Kontrolltiere ab. In den Seren tumortragender Tiere ließen sich ebenfalls Antikörper nachweisen. Ihr Spiegel ist umso höher, je später die Tiere Tumore aufwiesen.

Von den Strukturproteinen des OS-2 Virus sind hauptsächlich gp 71, p 15(E) und p 15 an der Immunreaktion beteiligt. Bei der Präzipitation von p 30 und p 12 handelt es sich dagegen um keine spezifische Antigen-Antikörperreaktion, da sie auch ohne Zugabe von Antikörpern gefällt werden können.

Summary

Antibodies to C-type RNA-viruses during the latency of radiation-induced osteosarcomas.

In sera of nonirradiated female (C3Hx101)F1 mice precipitating antibodies to a C-type virus (OS-2 virus) could be detected by radioimmunoassay. The antibody-level has a transient peak in the 4th month of life and rises continuously from the 7th month of life.

Irradiation with 224-Ra increases the level of antibodies in comparison to that of control animals with peaks in the 3rd and 7th month after start of irradiation. The average level is 4,5fold higher than that of untreated animals until the 7th month of treatment. From the 8th to 11th month after start of irradiation the antibody-level falls nearly to that of the control animals. In sera of tumor-bearing mice antibodies were also detectable. Their level is the higher the later the animals showed tumors.

Only some of the structural proteins of the OS-2 virus, gp 71, p 15(E) and p 15, are mainly involved in the immunoreaction. The precipitation of p 30 and p 12 is no specific antigen-antibody reaction, because they can also be precipitated without addition of antibodies.

6. Literaturverzeichnis

1 AARONSON, S.A., STEPHENSON, J.R.
Endogenous type-C RNA viruses of mammalian cells
Biochimica et Biophysica Acta 458: 323-354 (1976)

2 ARTHUR, L.O., BAUER, R.F., ORNE, L.S., FINE, D.L.
Coexistence of the mouse mammary tumor virus (MMTV) major glycoprotein and natural antibodies to MMTV in sera of mammary tumor-bearing mice
Virology 87: 266-275 (1978)

3 BOIOCCHI, M., NOWINSKI, R.C.
Polymorphism in the major core protein (p 30) of murine leukemia viruses as identified by mouse antisera
Virology 84: 530-535 (1978)

4 CHARMAN, H.P., GARDNER, M.B., MC ALLISTER, R.M., KIM, N., GILDEN, R.V.
Humoral immune responses of cats to mammalian type-C virus p 30s
Int. J. Cancer 17: 98-108 (1976)

5 ERFLE, V., LUZ, A., ADLER, I.-D., MARQUART, K.-H.
Attempts to recognize an oncogenic virus in Ra-224 induced murine osteosarcomas
Radiat. Res. 59: 90 (1974)

6 ERFLE, V., HEHLMANN, R., MARQUART, K.-H., BÜSCHER, H., DE FRIES, E., STRUBEL, L., LUZ, A.
C-type RNA viruses as possible predictors of radiation-induced bone oncogenesis
"Late biological effects of ionizing radiation"
IAEA, Vienna 1: 471-481 (1978)

7 ERFLE, V., HEHLMANN, R., SCHETTERS, H., MEIER, A., MARQUART, K.-H., LUZ, A.
C-Type RNA virus expression during the latency period of radiation-induced osteosarcomas
Manuskript, in Vorbereitung

8 ERFLE, V., MARQUART, K.-H.
Expression of type-C RNA virus particles in 224-Ra-induced osteosarcomas
"Biological effects of 224-Ra. Benefit and risk of therapeutical application"
(Herausg. Müller, W.A., Ebert, H.G.)
Martinus Nijhoff Medica Division, The Hague/Boston 158-167 (1978)

9 ERFLE, V., SCHULTE-OVERBERG, S., MARQUART, K.-H., ADLER, I.-D., LUZ, A.
Establishment and characterization of C-type RNA virus-producing cell lines from radiation-induced murine osteosarcomas
Manuskript, in Vorbereitung

10 FINKEL, M.P., REILLY, C.A.JR., BISKIS, B.O., GRECO, I.L.
Bone tumor viruses
"Bone - Certain aspects of neoplasia"
(Herausg. Price, C.H.G., Ross, F.G.M.)
London, Butterworths 353-364 (1973)

11 GEERING, G., AOKI, T., OLD, L.J.
Shared viral antigen of mammalian leukemia viruses
Nature 226: 265-266 (1970)

12 GERLOFF, R.K., HOYER, B.H., MC LAREN, L.C.
Precipitation of radiolabeled poliovirus with specific antibody and antiglobulin
J. Immunology 89: 559-570 (1962)

13 GILDEN, R.V., OROSZLAN, S., HUEBNER, R.J.
Coexistence of intraspecies and interspecies specific antigenic determinants on the major structural polypeptide of mammalian C-type viruses
Nature New Biology 231: 107-108 (1971)

14 GILDEN, R.V.
Biology of RNA tumor viruses
"The molecular biology of animal viruses"
Marcel Dekker, New York and Basel 435-542 (1977)

15 HANNA, M.G.JR., TENNANT, R.W., YUHAS, J.M.
Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus antigens in mice with a low natural incidence of lymphoma
Cancer Research 32: 2226-2234 (1972)

16 HANNA, M.G.JR., IHLE, J.N., BATZING, B.L., TENNANT, R.W., SCHENLEY, C.K.
Assessment of reactivities of natural antibodies to endogenous RNA tumor virus envelope antigens and virus-induced cell surface antigens
Cancer Research 35: 164-171 (1975)

17 HINO, S., STEPHENSON, J.R., AARONSON, S.A.
Radioimmunoassay for the 70000-molecular-weight glycoproteins of endogenous mouse type-C viruses: Viral antigen expression in normal mouse tissues and sera
J. Virology 18: 933-941 (1976)

18 HUEBNER, R.J., SARMA, P.S., KELLOFF, G.J., GILDEN, R.V., WEISS, R., WEBBS, S.R., PETRAS, S.L.
Immunological tolerance to RNA tumor virus genome expressions: Significance of tolerance and prenatal expressions in embryogenesis and tumorigenesis
Ann. N. Y. Acad. Sci. 181: 246-271 (1971)

19 HUEBNER, R.J., TODARO, G.J.
Oncogenes of RNA-tumor viruses as determinants of cancer
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64: 1087-1094 (1969)

20 HUG, O., GÖSSNER, W., MÜLLER, W.A., LUZ, A., HINDRINGER, B.
Production of osteosarcomas in mice and rats by incorporation of Radium-224
"Radiation induced cancer"
IAEA, Vienna, 393-400 (1969)

21 IHLE, J.N., YURCONIC, M.JR., HANNA, M.G.JR.
Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus. Radioimmune precipitation assay of mouse serum antibody levels
J. Exp. Medicine 138: 194-208 (1973)

22 IHLE, J.N., HANNA, M.G.JR., ROBERSON, L.E., KENNEY, F.T.
Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus. Identification of antibody reactivity to select viral antigens
J. Exp. Medicine 139: 1568-1581 (1974)

23 IHLE, J.N., DOMOTOR, J.J.JR., BENGALI, K.M.
Strain-dependent development of an autogenous immune response in mice to endogenous C-type viruses
Comparative Leukemia Research: Bibl. Haemat. 43: 177-179 (1975)

24 IHLE, J.N., HANNA, M.G.JR., SCHÄFER, W., HUNSMANN, G., BOLOGNESI, D.P., HÜPER, G.
Polypeptides of mammalian oncornaviruses. III. Localization of p 15 and reactivity with natural antibody
Virology 63: 60-67 (1975)

25 IHLE, J.N., ARTHUR, L.O., FINE, D.L.
Autogenous immunity to mouse mammary tumor virus in mouse strains of high and low mammary tumor incidence
Cancer Research 36: 2840-2844 (1976)

26 IHLE, J.N., DENNY, T.P., BOLOGNESI, D.P.
Purification and serological characterization of the major envelope glycoprotein from AKR murine leukemia virus and its reactivity with autogenous immune sera from mice
J. Virology 17: 727-736 (1976)

27 IHLE, J.N., DOMOTOR, J.J.JR., BENGALI, K.M.
Characterization of the type and group specifities of the immune response in mice to murine leukemia viruses
J. Virology 18: 124-131 (1976)

28 IHLE, J.N., JOSEPH, D.R., PAZMINO, N.H.
Radiation leukemia in C57Bl/6 mice.
II. Lack of ecotropic virus expression in the majority of lymphomas
J. Exp. Medicine 144: 1406-1423 (1976)

29 IHLE, J.N., MC EWAN, R., BENGALI, K.
Radiation leukemia in C57Bl/6 mice.
I. Lack of serological evidence for the role of endogenous ecotropic viruses in pathogenesis
J. Exp. Medicine 144: 1391-1405 (1976)

30 IKEDA, H., HARDY, W.JR., TRESS, E., FLEISSNER, E.
Chromatographic separation and antigenic analysis of proteins of the oncornaviruses.
V. Identification of a new murine viral protein, p 15(E)
J. Virology 16: 53-61 (1975)

31 KLEMENT, V., GARDNER, M.B., HENDERSON, B.E., IHLE, J.N., ESTES, J.D., STANLEY, A.G., GILDEN, R.V.
Inefficient humoral immune response of lymphoma-prone wild mice to persistent leukemia virus infection
J. Natl. Cancer Inst. 57: 1169-1173 (1976)

32 LAEMMLI, U.K.
Clearage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227: 680-685 (1970)

33 LEVY, J.A.
Xenotropic type-C viruses
"Current tropics in microbiology and immunology"
Springer-Verlag, Berlin 111-213 (1978)

34 LUZ, A., MÜLLER, W.A., GÖSSNER, W., HUG, O.
The dependence of late effects in mice on the temporal distribution of skeletal α-doses from 224-Ra and 227-Th
"Biological effects of 224-Ra. Benefit and risk of therapeutical application"
(Herausg. Müller, W.A., Ebert, H.G.)
Martinus Nijhoff Medical Division, The Hague/Boston
135-148 (1978)

35 MAIZEL, J.V.JR.
Polyacrylamid gel electrophoresis of viral proteins
"Methods in Virology"
Academic Press, New York and London 5: 179-246 (1971)

36 MÜLLER, M., HAGEMAN, P.C., DAAMS, J.H.
Spontaneous occurence of precipitating antibodies to the mammary tumor virus in mice
J. Natl. Cancer Inst. 47: 801-805 (1971)

37 NOWINSKI, R.C., KAEHLER, S.L.
Antibody to leukemia virus: Widespread occurence in inbred mice
Science 185: 869-871 (1974)

38 NOWINSKI, R.C., KAEHLER, S.L., BARON, J.
Genetic control of natural immunity to ecotropic mouse leukemia viruses: Production of endogenous immunogen
Infection and Immunity 13: 1091-1097 (1976)

39 NOWINSKI, R.C., WATSON, A.
Immune response of the mouse to the major core protein (p 30) of ecotropic leukemia viruses
J. Immunology 117: 693-696 (1976)

40 OLDSTONE, M.B., AOKI, T., DIXON, F.J.
The antibody response of mice to murine leukemia virus in spontaneous infection: Absence of classical immunologic tolerance
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 134-138 (1972)

41 PARKS, W.P., LIVINGSTON, D.M., TODARO, G.J., BENVENISTE, R.E., SCOLNICK, E.M.
Radioimmunoassay of mammalian type-C viral proteins. III. Detection of viral antigen in normal murine cells and tissues
J. Exp. Medicine 137: 622-635 (1973)

42 REISNER, A.H., NEMES, P., BUCHOLTZ, C.
The use of coomassie brilliant blue G 250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels
Anal. Biochem. 64: 509-516 (1975)

43 SCHÄFER, W.
Onkogene Viren - ein Überblick
Zbl. Bakt. Hyg. I.Abt. Orig.A 220 3-26 (1972)

44 SCHWARTZ, R.S., DONNELLY, J., MELIEF, C.J.M., LOUIE, S.
Immunity to C-type RNA viruses: Antibody formation after natural or deliberate infection
J. Immunology 116: 657-660 (1976)

45 STEPHENSON, J.R., PETERS, R.L., HINO, S., DONAHOE, R.M., LONG, L.K., AARONSON, S.A., KELLOFF, G.J.
Natural immunity in mice to structural polypeptides of endogenous type-C RNA viruses
J. Virology 19: 890-898 (1976)

46 STEPHENSON, J.R., ESSEX, M., HINO, S.,
HARDY, W.D.JR., AARONSON, S.A.
Feline oncornavirus-associated cell-membrane
antigen (FOCMA): Distinction between FOCMA
and the major virion glycoprotein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1219-1223 (1977)

47 WEBER, K., OSBORN, M.
The reliability of molecular weight determinations
by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
J. Biol. Chem. 244: 4406-4412 (1969)

48 WEISLOW, O.S., SCHNEIDER, S., HEBERLING, R.L.,
KALTER, S.S., HELLMAN, A.
Autogenous humoral immunity to baboon xenotropic
endogenous type-C virus
J. Natl. Cancer Inst. 57: 561-565 (1976)

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas danken.

Für die wissenschaftliche Anleitung und die praktische Unterstützung gilt Herrn Dr. V. Erfle und Herrn Dr. H. Schetters mein besonderer Dank.

Den Technischen Assisstentinnen in der Abteilung für Veterinärmedizin der GSF, insbesondere Frl. E. Jatho, danke ich für die Hilfeleistungen bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 02. 02. 1953 wurde ich als Sohn des Regierungsveterinärassessors Dr. Hans-Eberhard Meier und seiner Ehefrau Hanneliese, geborene Cramer, in Freiburg im Breisgau geboren.

Von 1959 - 1963 besuchte ich die Volksschule in Donaueschingen und wechselte von dort auf das Fürstenberg-Gymnasium in Donaueschingen über, wo ich 1971 mit dem Abitur abschloß.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich in München mit dem Studium der Veterinärmedizin und legte am 09. 11. 1976 das Staatsexamen ab. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 29. 11. 1976.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich im Januar 1977 begonnen.